

POTENSI BAKTERI ASAM LAKTAT YANG DIISOLASI DARI BEKASAM SEBAGAI PENGHASIL ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITOR PADA FERMENTASI “BEKASAM-LIKE” PRODUCT

Potency of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bekasam as Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor Producing-Bacteria in Fermentation of “Bekasam-Like” Product

^{1,2}Prima Retno Wikandari, ²Suparmo, ²Yustinus Marsono, ²Endang Sutriswati Rahayu

¹Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Gedung C3 Kampus Unesa, Ketintang, Surabaya 60231

²Jurusan Teknologi Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora No. 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281
Email: wikandari@yahoo.com

ABSTRAK

Bekasam adalah salah satu produk ikan fermentasi tradisional. Produk ini diduga mempunyai aktivitas antihipertensi yang disebabkan oleh aktivitas peptida *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) inhibitor yang dihasilkan dari degradasi proteolitik selama proses fermentasi bekasam. Bakteri asam laktat diduga berperan dalam degradasi proteolitik menghasilkan peptida ACE inhibitor pada fermentasi bekasam. Sebanyak 6 strain bakteri asam laktat terpilih yang diisolasi dari bekasam yaitu *Lactobacillus plantarum* B1765, *L. plantarum* T2565, *L. plantarum* N2352, *L. plantarum* B1465, *Lactobacillus pentosus* B2555, *Pediococcus pentosaceus* B1661 telah dikaji pertumbuhan, jumlah peptida yang terbentuk dari hasil degradasi proteolitik dan presentase penghambatannya terhadap aktivitas ACE selama fermentasi “bekasam-like” product. Semua strain dapat tumbuh dengan baik dan menunjukkan peningkatan jumlah peptida dan peningkatan aktivitas penghambatan selama proses fermentasi yang bervariasi antar strain. Jumlah peptida tertinggi pada akhir proses fermentasi ($8,55 \pm 0,05$ mg/g) dihasilkan *L. plantarum* B1765 dan terkecil ($4,45 \pm 0,10$ mg/g) dihasilkan oleh *P. pentosaceus* B1661. *L. plantarum* B1765 juga menghasilkan aktivitas penghambatan tertinggi ($68,17 \pm 1,32\%$), diikuti oleh *L. plantarum* T2565 ($62,54 \pm 2,11\%$), *L. plantarum* N2352 ($61,56 \pm 1,32\%$), *L. plantarum* B1465 ($59,85 \pm 1,58\%$), *L. pentosus* B2555 ($56,61 \pm 4,28\%$), aktivitas penghambatan terkecil dihasilkan oleh *P. pentosaceus* B1661 ($18,66 \pm 3,91\%$).

Kata kunci: Bekasam, fermentasi, bakteri asam laktat, peptida, ACE inhibitor

ABSTRACT

Bekasam, an traditional fermented fish is perceived to have antihypertensive activity, which was estimated to be the activity of ACE inhibitory peptides, the product of proteolytic degradation of fish protein during the *bekasam* fermentation. Lactic acid bacteria was possibly to give a role on proteolytic degradation to produce ACE inhibitor peptides in *bekasam* fermentation. Six strains of the selected strains of proteolytic lactic acid bacteria from *bekasam*, namely *Lactobacillus plantarum* B1765, *L. plantarum* T2565, *L. plantarum* N2352, *L. plantarum* B1465, *Lactobacillus pentosus* B2555, and *Pediococcus pentosaceus* B1661, were assessed for growth characteristics. The amount of peptides as result of proteolytic degradation, and the inhibitory activities of ACE inhibitor which is released in fermentation of “*bekasam-like*” product. All selected strains grew well, exhibited proteolytic activity which was showed by the increasing of peptides. The extent of proteolysis varied among strains and appeared to be time dependant. The highest peptides (8.55 ± 0.05 mg/g sample) was found on *L. plantarum* B1765 and the smallest one (4.45 ± 0.10 mg/g sample) on *P. pentosaceus* B1661. *L. plantarum* B1765 exhibited the highest ACE inhibitor activity ($68.17 \pm 1.32\%$), followed

by *L. plantarum* T2565 ($62.54 \pm 2.11\%$), *L. plantarum* N2352 ($61.56 \pm 1.32\%$), *L. plantarum* B1465 ($59.85 \pm 1.58\%$), and *L. pentosus* B2555 ($56.61 \pm 4.28\%$), whereas *P. pentosaceus* B1661 ($18.66 \pm 3.91\%$) showed the smallest one.

Keywords: Bekasam, fermentation, lactic acid bacteria, peptide, ACE inhibitor

PENDAHULUAN

Bakteri asam laktat telah lama dikenal banyak dimanfaatkan secara luas dalam industri berbagai produk fermentasi seperti susu, minuman, sayuran, daging dan ikan. Hasil metabolisme bakteri asam laktat menghasilkan tekstur dan cita rasa yang khas pada berbagai makanan fermentasi. Berbagai asam organik yang dihasilkan menjadi faktor penting dalam pengawetan makanan.

Pada saat ini peran bakteri dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan banyak mendapatkan perhatian untuk diteliti dan dikembangkan. Bakteri asam laktat dan produk fermentasinya diketahui mampu menurunkan tekanan darah dan menghasilkan peptida bioaktif yang mampu menghambat aktivitas *Angiotensin I Converting Enzyme* (ACE), suatu enzim yang berperan dalam mengatur tekanan darah dalam sistem Renin-Angiotensin.

Peran bakteri asam laktat seperti *L. helveticus*, *L. delbrueckii* subs.*bulgaricus* SS 1, *L. lactis* subs.*cremoris*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecalis* dalam menghasilkan ACE inhibitor dan menurunkan tekanan darah tikus hipertensi telah ditemukan pada produk susu fermentasi (Nakamura dkk., 1995; Maeno dkk., 1996; Yamamoto, 1999; Gobetti dkk., 2000; Seppo dkk., 2003; Muguerza dkk., 2006; Songisepp dkk., 2009). Penelitian tentang potensi bakteri asam laktat pada produk ikan fermentasi dalam menghasilkan ACE inhibitor masih sangat terbatas. Yin dkk. (2002a) menemukan bahwa inokulasi *Lactobacillus plantarum*, *L. lactis*, *L. helveticus* pada substrat ekstrak ikan makarel mampu menurunkan tekanan darah tikus SHR. Produk ikan fermentasi *heshiko* dan *narazushi* juga diketahui mampu menurunkan tekanan darah tikus SHR dan mampu menghambat aktivitas ACE (Itou dan Akahane, 2004; Itou dkk., 2007).

Aktivitas ACE inhibitor yang dihasilkan oleh bakteri asam laktat diketahui sejalan dengan peningkatan jumlah peptida hasil degradasi proteolitik bakteri asam laktat (Fuglsang dkk., 2003; Quiros dkk., 2007). Beberapa sistem proteolitik bakteri asam laktat dalam menghasilkan peptida bioaktif antihipertensi juga telah ditemukan. Enzim proteinase ekstraseluler yang diisolasi dari *Lb. helveticus* CP 790 dan diinokulasikan pada susu diketahui menghasilkan peptida antihipertensi Val-Pro-Pro dan Ile-Pro-Pro (Yamamoto dkk., 1999; Maeno dkk., 1996). Pembentukan ACE inhibitor adalah gabungan aksi proteinase dan peptidase ekstraseluler yang

terikat pada dinding sel (Minervini dkk., 2003). Jenis enzim karboksil-endopeptidase yang diisolasi dari *L. helveticus* CM 4 mampu menghasilkan peptida antihipertensi Val-Pro-Pro dan Ile-Pro-Pro (Oeno dkk., 2004).

Bekasam adalah produk fermentasi ikan yang terbuat dari campuran ikan, nasi dan garam. Bekasam diketahui mampu menghasilkan ACE inhibitor dengan aktivitas penghambatan 51,77% - 65,75% (Wikandari dkk., 2009a; 2009b). Aktivitas bakteri asam laktat proteolitik indigenous pada bekasam diduga ikut berperan dalam menghasilkan peptida yang berpotensi sebagai ACE inhibitor. Hasil seleksi dan identifikasi bakteri asam laktat proteolitik menunjukkan bahwa dari 150 isolat bakteri asam laktat indigenous bekasam didapatkan 6 (enam) strain bakteri asam laktat proteolitik homofermentatif dengan aktivitas proteolitik tinggi, yaitu *L. plantarum* B765, *L. plantarum* T2565, *L. plantarum* N2352, *L. plantarum* B1465, *L. pentosus* B2555, dan *Pediococcus pentosaceus* B1661 (Wikandari dkk., 2010).

Pada penelitian ini dikaji lebih lanjut tentang potensi isolat-isolat terpilih tersebut dalam menghasilkan ACE inhibitor dalam proses fermentasi “bekasam-like” product yaitu proses fermentasi bekasam yang dilakukan dengan mensterilkan bahan dasar bekasam yaitu ikan, nasi dan daging untuk menghilangkan pengaruh degradasi proteolitik oleh enzim proteolitik indigenous dan mikroorganisme proteolitik lainnya yang terdapat pada bahan dasar. Penelitian ini bertujuan untuk (1) mengetahui pertumbuhan bakteri asam laktat proteolitik terpilih selama proses fermentasi “bekasam-like” product, 2) mempelajari proses degradasi proteolitik selama proses fermentasi “bekasam-like” product dengan kultur starter bakteri asam laktat proteolitik terpilih, (3) mengkaji potensi strain bakteri asam proteolitik terpilih dalam menghasilkan ACE inhibitor pada “bekasam-like” product.

BAHAN DAN METODE

Pembuatan “bekasam-like” Product

Keenam bakteri asam laktat proteolitik terpilih dari isolat bekasam yaitu *L. plantarum* B765, *L. plantarum* T2565, *L. plantarum* N2352, *L. plantarum* B1465, *L. pentosus* B2555, dan *Pediococcus pentosaceus* B1661 yang digunakan sebagai kultur starter dalam pembuatan “bekasam-like” product

diperoleh dari *stock culture* yang disimpan dalam MRS dan gliserol 30% 1:1, dan disimpan pada suhu -60 °C. Pembuatan “bekasam-like” product dilakukan menurut metode Yin dkk. (2002a). Setelah dilakukan 2 (dua) kali *sub culture* isolat dalam MRS *broth* selama 24 jam, masing-masing isolat dinokulasikan sebanyak 10^6 CFU/g pada ikan bandeng yang telah dibersihkan insang dan isi perutnya, dicampur nasi (1:1) dan garam 10% (b/b). Dilakukan sterilisasi terlebih dahulu pada suhu 100 °C selama 30 menit, sebelum dilakukan inokulasi. Selanjutnya dilakukan fermentasi selama 7 hari pada suhu ruang (± 29 °C) dalam wadah yang tertutup rapat. Hasil fermentasi terkontrol ini disebut sebagai “bekasam-like” *product*. Bekasam adalah produk ikan fermentasi secara spontan.

Enumerasi Bakteri Asam Laktat

Enumerasi dilakukan dengan metoda pengenceran dan *plating* dengan cara sebanyak 10 g sampel dicampur dengan 90 ml larutan garam 0,86% dan dihomogenasi dengan *stomacher* selama 2 menit. Selanjutnya dilakukan pengenceran sampai dengan 10^{-7} dan dilakukan *plating* dengan metoda *poured plate* pada media agar MRS yang ditambah dengan 0,5% (b/V) CaCO_3 , selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Enumerasi dilakukan pada pengenceran tertentu yang memberikan hitungan 30 – 300 koloni.

Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan menurut Kuba dkk. (2003) dengan modifikasi. Dibuat suspensi sampel ± 5 g dalam 25 ml aquades, sampel dihomogenasi dengan alat *stomacher* dengan kecepatan tinggi selama 10 menit. Pemisahan protein terlarut dilakukan dengan alat *centrifuge* pada $12.000 \times g$ selama 15 menit, endapan dipisahkan dan supernatan dididihkan selama 30 menit. Selanjutnya endapan dipisahkan lagi dengan kecepatan $12.000 \times g$ selama 15 menit dengan *centrifuge*. Supernatan sampel diambil 10 ml dan ditambahkan TCA 10% sebanyak 2 ml, selanjutnya endapan dipisahkan dengan alat *centrifuge* dengan kecepatan $20.000 \times g$ selama 15 menit dan supernatan dipisahkan dengan cara disaring dengan kertas Whatman No 2. Ekstrak sampel larut TCA selanjutnya digunakan dalam pengujian degradasi proteolitik dan pengukuran aktivitas ACE inhibitor.

Pengukuran Degradasi Proteolitik

Degradasi proteolitik diukur dengan parameter jumlah peptida yang terbentuk selama fermentasi “bekasam-like” *product*. Penentuan jumlah peptida dilakukan dengan metode OPA (Church dkk., 1983). Sebanyak 50 μl sampel dicampur dengan 2 ml reagen OPA yang terdiri dari 50 ml campuran yang mengandung 25 ml, 100 mmol sodium metaborate, 2,5 ml

SDS 20% (w/w), 40 mg OPA (o-phthaldialdehyde) dilarutkan di dalam 1 ml metanol, dan 100 μl β -mercaptoethanol di dalam *disposable cuvette*. Campuran diinkubasi selama 2 menit, selanjutnya absorbansi sampel diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm. Penghentikan peptida dilakukan dengan kurva regresi linier dengan standar dipeptida Leu-Gly.

Pengukuran Aktivitas ACE Inhibitor

Penentuan aktivitas ACE inhibitor dilakukan menurut metode Chusman dan Cheung, (1971) dengan modifikasi. Ekstrak sampel larut TCA diatur pH nya hingga netral dengan penambahan NaOH 5N. Sebanyak 65 μl larutan sampel ditambahkan substrat 75 μl (5 mM Hip-His-Leu di dalam 0,1M buffer sodium borat yang mengandung 0,3M NaCl pada pH 8,3) dan dipreinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Selanjutnya campuran diinkubasi dengan 25 μl enzim ACE 2,5 mU/ml pada suhu 37 °C selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 250 μl HCl 1 M. Asam hippurat yang dihasilkan diekstraksi dengan 0,5 ml etil asetat. Setelah disentrifugasi (800g, 2 menit), sebanyak 0,2 ml lapisan atas dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan dievaporasi pada suhu 100 °C selama 30 menit. Asam hippurat yang dibebaskan dilarutkan di dalam 1,0 ml aquadest, dan diukur absorbansinya pada 288 nm menggunakan spektrofotometer UV. Aktivitas ACEI dihitung sebagai prosentase penghambatan terhadap aktivitas ACE dengan rumus berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = (A-B) / (A-C) \times 100\%$$

A = absorbansi enzim ACE + substrat

B = absorbansi sampel + enzim ACE + substrat

C = absorbansi substrat + sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan Jumlah Bakteri Asam Laktat dan pH selama Fermentasi

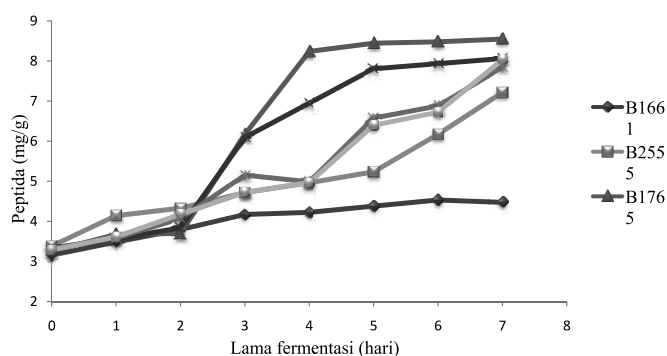
Semua isolat menunjukkan nilai yang relatif sama dalam peningkatan jumlah populasinya yaitu dari $\pm 10^6$ CFU/g pada awal fermentasi menjadi $\pm 10^9$ CFU/g pada hari ke 3 atau ke 4, dan selanjutnya relatif konstan hingga hari ke-7 proses fermentasi. Dengan demikian diduga rata-rata fase log isolat terjadi pada hari ke-1 hingga hari ke-4, dan selanjutnya memasuki fase stationer yang dicapai mulai hari ke-4 hingga hari ke-7.

Peningkatan jumlah populasi bakteri asam laktat diikuti dengan penurunan nilai pH. Nilai pH pada awal proses fermentasi antara 5,93-6,09 menurun menjadi 4,84-4,27 terjadi hingga hari ke-5, selanjutnya menunjukkan nilai yang relatif sama sampai dengan akhir proses fermentasi.

Penurunan pH disebabkan oleh terbentuknya asam-asam organik hasil metabolisme asam laktat. Perubahan jumlah populasi bakteri asam laktat dan pH yang dihasilkan ini sesuai dengan hasil penelitian Yin dkk. (2002a), dan Yin dkk. (2002b) yang telah mempelajari pengaruh fermentasi bakteri asam laktat *L. plantarum* dan *P. pentosaceus* pada ikan makarel, dan hasil penelitian Ndaw dkk. (2008) pada fermentasi dengan *L. delbrueckii subsp delbrueckii* pada ikan sardine.

Degradasi Proteolitik

Degradasi proteolitik dari masing-masing isolat ditunjukkan oleh perubahan jumlah peptida yang terbentuk selama fermentasi dengan metode OPA. *L. plantarum* menunjukkan jumlah peptida yang relatif lebih tinggi dibandingkan *L. pentosus* dan *P. pentosaceus*. Proses fermentasi dengan *L. plantarum* B1765 menghasilkan konsentrasi peptida tertinggi $8,54 \pm 0,05$ mg/g sampel pada akhir fermentasi, sedangkan konsentrasi peptida terendah ditunjukkan oleh *P. pentosaceus* B1661 ($4,46 \pm 0,06$ mg/g sampel). Konsentrasi peptida pada awal fermentasi antara 3,15- 3,39 mg/g sampel (Gambar 1).



Gambar 1. Perubahan jumlah peptida selama fermentasi “bekasam-like” product dengan isolat BAL proteolitik bekasam

Terjadinya peningkatan jumlah peptida pada fermentasi bekasam diduga terjadi karena adanya aktivitas proteolitik dari strain *L. plantarum*, *L. pentosus*, dan *P. pentosaceus* pada protein ikan oleh aktivitas proteinase dan peptidase bakteri asam laktat. Dugaan ini didasarkan pada hasil-hasil penelitian sebelumnya. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa aktivitas proteolitik bakteri asam laktat mampu mendegradasi protein otot dan protein sarkoplasma pada ikan (Fadda dkk., 1999; Fadda dkk., 2010; Sriphochanart dan Wanwisa, 2010; Xu dkk., 2010). Beberapa spesies *L. plantarum* diketahui mempunyai proteinase ekstraseluler (Marathe dan Ghos, 2009; Strahinic dkk., 2010). Proteinase ekstraseluler ditemukan pada strain *L. pentosus* dan *L. plantarum* dari isolat keju

(De-Angelis dkk., 2001). Enzim peptidase intraseluler yang telah dapat diisolasi dari *L. plantarum* (Rolland dkk., 2005; Gerez dkk., 2008), *P. pentosaceus* juga diketahui mempunyai aktivitas peptidase intraseluler (Simitsupoulou dkk., 1997; Gerez dkk., 2008).

Peningkatan jumlah peptida terjadi hingga hari ke 5 dan selanjutnya menunjukkan kenaikan yang relatif lambat hingga akhir proses fermentasi. Terkait dengan fase pertumbuhan bakteri asam laktat maka terjadinya degradasi proteolitik yang ditunjukkan oleh peningkatan jumlah peptida terjadi hingga mencapai fase stationer. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Quiros dkk. (2007) yang menyatakan bahwa terjadinya proteolisis pada susu fermentasi yang diinokulasi dengan *Enterococcus faecalis* CECT 5727 terjadi hingga bakteri dimaksud mencapai fase stationer.

Peningkatan jumlah peptida pada proses fermentasi diduga akibat terjadinya degradasi protein ikan menjadi oligopeptida-oligopeptida oleh proteinase ekstraseluler, atau peptidase ekstraseluler, akan tetapi adanya peptidase ekstraseluler ini masih menjadi kontroversi (Kunji dkk., 1996). Walaupun demikian peptidase ekstraseluler ditemukan pada ekstrak sel utuh dari beberapa bakteri asam laktat seperti *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *P. pentosaceus* dan *Leuconostoc mesentroides* (Matthews dkk., 2004). Peningkatan jumlah peptida juga diduga sebagai akibat terjadinya sekresi peptida-peptida kecil hasil degradasi peptidase intraseluler ke luar sel melalui membran sel (Kunji dkk., 1996).

Rendahnya jumlah peptida yang dihasilkan selama proses fermentasi “bekasam-like” product dengan *P. pentosaceus* B1661 pada penelitian ini diduga disebabkan karena *P. pentosaceus* mempunyai sistem enzim proteolitik yang lebih sempit spesifitasnya dalam mendegradasi protein menjadi peptida-peptida dan asam-asam amino dibandingkan *L. plantarum*. Matthews dkk., (2004) juga menemukan bahwa *P. pentosaceus* tidak mempunyai sistem eksoproteinase dan endopeptidase, walaupun ditemukan adanya enzim-enzim peptidase intraseluler.

Aktivitas ACE Inhibitor Bakteri Asam Laktat Proteolitik Isolat Bekasam

Hasil penelitian menunjukkan bahwa keenam isolat yang diuji kesemuanya menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap ACE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat strain *L. plantarum* kesemuanya mampu menghasilkan aktivitas penghambatan $\pm 60\%$ pada akhir proses fermentasi dengan persentase penghambatan tertinggi dihasilkan oleh strain *L. plantarum* B1765 ($68,17 \pm 1,32\%$). *L. pentosus* B2555 menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih rendah ($56,61 \pm 4,28\%$) sedangkan *P. pentosaceus* B1661

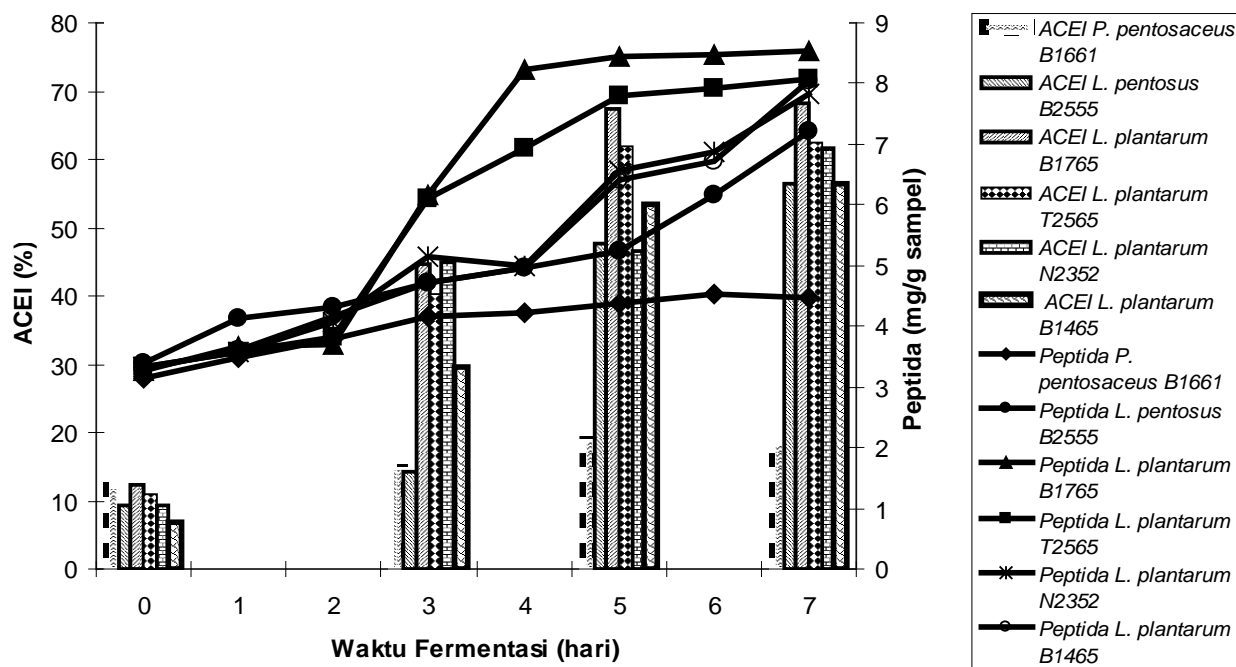
menunjukkan penghambatan yang relatif kecil sebesar ($18,66 \pm 3,91\%$) pada akhir proses fermentasi.

Besarnya aktivitas penghambatan ACE diketahui berkorelasi dengan peningkatan peptida yang terbentuk selama proses fermentasi (Gambar 2). Adanya korelasi ini juga ditunjukkan oleh Fuglsang dkk. (2003) dan Quiros dkk. (2007) dalam penelitiannya tentang aktivitas penghambatan ACE oleh bakteri asam laktat yang diisolasi dari susu.

Aktivitas penghambatan ACE pada “bekasam-like” product diduga berkaitan dengan terbentuknya peptida dalam bentuk oligopeptida-oligopeptida dengan jumlah residu yang relatif besar maupun di atau tripeptida hasil aktivitas proteinase ekstraseluler dan peptidase intraseluler bakteri asam laktat. Dugaan ini didasarkan pada hasil penelitian lain yang menunjukkan bakteri asam laktat *L. helveticus* diketahui mampu menghasilkan inhibitor ACE dengan 20-24 residu asam amino, dan juga dihasilkan peptida kecil dengan 2-8 residu asam amino oleh aktivitas proteinase (Minervini dkk., 2003; Maeno dkk., 1996). Peptida dengan residu asam amino yang lebih kecil memberikan penghambatan yang lebih besar (Yamamoto dkk., 2003). Peptida antihipertensi diduga juga dihasilkan oleh peptidase intraseluler yang akan dikeluarkan kembali ke dalam produk melalui lisis sel atau pertukaran peptida melalui membran (Kunji dkk., 1996; Fandino dkk., 2006). Peptida ACE inhibitor VPP dan IPP dihasilkan dari aktivitas peptidase intraseluler (Yamamoto dkk., 1999).

Walaupun aktivitas *L. plantarum* dalam menghasilkan inhibitor ACE sudah ditemukan pada susu fermentasi (Songisepp dkk., 2009), penemuan tentang aktivitas *L. plantarum* dalam menghasilkan inhibitor ACE pada ikan fermentasi baru ditemukan pada penelitian ini dengan aktivitas penghambatan tertinggi dihasilkan oleh strain *L. plantarum* B1765. Belum ditemukan data tentang potensi strain *L. pentosus* dan dalam menghasilkan ACE inhibitor seperti yang ditemukan pada penelitian ini yang dihasilkan oleh *L. pentosus* B2555. *Pediococcus pentosaceus* B1661 menunjukkan penghambatan yang relatif kecil. Hasil penelitian pada substrat susu juga menunjukkan bahwa *Pediococcus pentosaceus* tidak menunjukkan aktivitas ACE inhibitor ((Harun-ur-Rosyid dkk., 2007).

Penelitian tentang aktivitas inhibitor ACE pada produk ikan telah dilakukan dari hasil hidrolisis protein ikan dengan enzim protease non mikroorganisme dengan aktivitas penghambatan antara 63- 79% (Bougatef dkk., 2008; Balti dkk., 2010). Dengan aktivitas penghambatan yang relatif sama dengan aktivitas penghambatan yang ditemukan pada penelitian ini, diduga kemungkinan ada kemiripan fraksi dan urutan residu asam amino peptida ACE inhibitor yang dihasilkan dari protein ikan oleh hidrolisis proteolitik enzim proteolitik bakteri asam laktat dalam penelitian ini.



Gambar 2. Hubungan antara lama fermentasi, konsentrasi peptida dan persentase penghambatan ACE pada “bekasam-like” product

KESIMPULAN

Isolat tunggal bakteri asam laktat proteolitik bekasam mampu tumbuh dengan baik pada “bekasam-like” *product*. Peningkatan jumlah peptida yang terjadi selama proses fermentasi menunjukkan adanya degradasi proteolitik oleh strain bakteri asam laktat yang diuji. *L. plantarum* B1765 mampu menghasilkan peptida tertinggi, sedangkan peningkatan peptida yang relatif kecil terjadi pada “bekasam-like” *product* yang diinokulasi dengan *P. pentosaceus* B1661. Aktivitas ACE inhibitor berkorelasi dengan peningkatan jumlah peptida dan bervariasi antar strain. Semua strain menghasilkan aktivitas ACE inhibitor pada “bekasam-like” *product*. *L. plantarum* B1765 menunjukkan aktivitas ACE inhibitor tertinggi (68,17%), sedangkan aktivitas ACE inhibitor terkecil ditunjukkan oleh *P. pentosaceus* (18,86%).

DAFTAR PUSTAKA

- Balti, R, Naima, N-A., Ali, B., Didier, G. dan Moncef, N. (2010). Three novel ace inhibitory peptides from cuttle fish (*Sepia officinale*) using digestive protease. *Food Research International* **43**: 1136-1143.
- Bougatef, A., Naima, N-A., Rozen, R-P., Yves, L., Didier, G., Ahmed, B. dan Moncef, N. (2008). ACE inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-product protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine protease. *Food Chemistry* **111**: 350-356.
- Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. dan Catignani, G. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk protein. *Journal of Dairy Science* **66**: 1219-127.
- Chusman dan Cheung (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* **20**: 1637-1648.
- Danil, M. (1995). *Bakteri Asam Laktat dari Penggaraman Ikan dan Ikan Fermentasi dan Uji Aktivitas Anti Bakteri*. Thesis. Jurusan Ilmu Pangan. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- De-Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R. dan Gobetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(5): 2011-2020.
- Fadda, S., Yolanda, S., Graciella V., M.-Concepción, A., Guillermo O. dan Fidel T. (1999). Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**(8):3540-3546.
- Fadda, S., Maria, J.V. dan Graciella, V. (2010). The acidogenic metabolism of *Lactobacillus plantarum* CRL 681 improves sarcoplasmic protein hydrolysing during meat fermentation. *Journal of Muscle Protein* **21**(3): 545-556.
- Fandino, R., L., Otte, J. dan Camp, J., (2006). Physiological, chemical, and technological aspect of milk protein-derived peptide with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal* **16**(11): 1277-1293.
- Fuglsang, A., Rattray, F.P., Nilsson, D. dan Nyborg, N.C.B. (2003). Lactic acid bacteria: inhibition of angiotensin converting enzyme in vitro and in vivo. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**: 27-34.
- Gerez, C-L., Font deValdez, G. dan Rolland, G.C. (2008). Functionality of lactic acid bacteria peptidase activities in the hydrolysis of gliadin-like fragment. *Applied Microbiology* **47**(5): 427-432.
- Gobetti M., Ferranti, P., Smacchi, E., Goffredi, F. dan Addeo, F. (2000). Production of angiotensin-i-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milk started by *Lactobacillus delbrueckii* subs.*bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp.*cremoris* FT4. *Applied and Environmental Microbiology* p. 3898-3904.
- Harun-ur-Rashid, Togo, K., Ueda, M. dan Miyamoto, T. (2007). Probiotic characteristic of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk “Dahi” in Bangladesh. *Pakistan Journal of Nutrition* **6**(6): 647-652.
- Itou, K. dan Akahane, Y. (2004). Antihypertensive effect of *heshiko*, a fermented mackerel product, on spontaneously hypertensive rat. *Fisheries Science* **70**: 1121-1129.
- Itou, K., Nagahashi, R., Saitou, M. dan Akahane, Y. (2007). A antihypertensive effect of *Narazushi*, a fermented mackerel product, on spontaneously hypertensive rat. *Fishery Science* **75**:1344-1352.
- Kuba, M., Tanaka, K., Tawata, S., Takeda, Y. dan Yasuda, M. (2003). Angiotensin i-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **67**(6): 1278-1283.
- Kunji, E.R., Mierou, L., Hagting, A., Poolman B. dan Konig W.N. (1996). The proteolytic system of lactic acid bacteria. *Antonie van Leewenhoek* **70**(2-4): 187-221.

- Maeno M., Yamamoto N., dan Takeno T. (1996). Identification of an antihypertensive peptides from casein hydrolyzate proceded by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal Dairy Science* **79**:1316-1321.
- Matthews, A., Antonio,G., Michelle,W., Eveline,B., Paul,G. dan Vladimir, J. (2004). Lactic acid bacteria as a potential source of enzymes for use in vinification. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(10): 5715-5731.
- Minervini, F., Algaron, F., Rizzello,C.G., Fox, P.F., Monnet, V. dan Gobetti, M. (2003). Angiotensin i-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Applied Enviromental Microbiology* **69**(9): 5297–5305.
- Muguerza, B., Ramos,M., Sanches, E., Manso, M.A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M.A. dan Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal* **16**: 64-69.
- Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. dan Takano T. (1995). Antihypertensive effect of sour milk and peptide isolated from it that are inhibit angiotensin–i-converting–enzyme. *Journal Dairy Science* **78**: 1253-1257.
- Ndaw, A.D., Faïd, M., Bouseta dan Zinedine. (2008). Effect of controlled lactic acid bacteria fermentation on microbiological and chemical quality of Moroccan sardines (*Sardina pilchardus*). *International Journal Agriculture Biology* **10**:21-27.
- Quiros A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M.A., Miguel, M., Alexendre, A. dan Recio, I. (2007). Identification of novel antyhypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal* **17**(1): 33-41.
- Oeno, K., Mizano, S. dan Yamamoto, N. (2004). Purification and characterization of an endopeptidase that has an important role in carboxyl terminal processing of antihypertensive peptide in *L.helveticus* CN 4. *Letters in Applied Microbiology* **39**: 513.
- Seppo L., Jauhinen, T., Poussa, T. dan Korpela, R. (2003). A fermented milk high in bioactive peptides has blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* **77**(2): 326-330.
- Simitsupoulou, M., Vatipoulou, A., Papadopoulou, T.C. dan Alichadinis, E. (1997). Purification and partial characterization of tripeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K92. *Applied Environment Microbiology* **63**(12): 4872-4876.
- Songisepp, E., Marika, M., Merle, R., Mihkel, Z., Pirje, H, Meene, U., Kersti, Z., Janne, U. dan Silsi, K. (2009). Isolated microorganism strain *L.plantarum* tensia DSM 21380 as antimicrobial and antihypertensive probiotic, food product and composition comprising said microorganism and use of said microorganism for preparation of antihypertensive medicine and methode for suppressing patogen and non starter *Lactobacilli* in food product. *Bolivent Patent-WO2009138091*.
- Strahinic, I., Kojic, M.,Tolinacki, M., Fira, D. dan Topisirovic, L. (2010). The presence of *prtP* proteinase gene in natural isolate *Lactobacillus plantarum* BGSJ3–18. *Letters in Applied Microbiology* **50**(1): 43-49.
- Sripochanart, W. dan Wanwisa, S. (2010). Characterization of proteolytic effect of lactic acid bacteria starter cultures on Thai fermented sausages. *Food Biotechnology* **24**(4): 293-311.
- Wikandari , P.R., Suparmo, Marsono, Y. dan Rahayu, E.S. (2009a). *Tinjauan Aspek Kimia, Mikrobiologi dan Sifat Antihipertensi Bekasam Nila (Oreochromis niloticus L)*. Makalah Seminar ISLAB, Universitas Gadjah Mada,Yogyakarta.
- Wikandari, P.R., Suparmo, Marsono, Y. Dan Rahayu, E.S. (2009b). *Characteristic of Microbiological, Chemical and Antihypertensive Activity of Tunnus sp Bekasam*. Paper on Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. National University of Singapore, Singapore.
- Xu, Y., Wenshui, X., Fang, Y. dan Xiahua, N. (2010). Physical and chemical changes of silver carp sausages during fermentation with *Pediococcus pentosaceus*. *Food Chemistry* **122**(3): 633-637.
- Yamamoto, N., Maeno, M. dan Takano, T. (1999). Purification and characterization of an antihypertensive peptides from yoghurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *Journal of Dairy Science* **82**: 1388-1393.
- Yamamoto N., Masahiro E. dan Seiichi M. (2003). Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design* **9**: 1345-1355.
- Yin, L.J., Pan, C.L. dan Jiang, S.T. (2002a). Effect of lactic acid bacterial fermentation on the characteristics of minced mackerel. *Journal of Food Science* **67**(2):786–92.
- Yin, L.J., Pan, C.L. dan Jiang, S.T. (2002b). New technology for producing paste-like fish product using lactic acid bacteria fermentation. *Journal of Food Science* **67**(8): 3114-3119.